1909

Aus dem hygienischen Institut der kgl. tierärztlichen Hochschule zu Berlin.
Leiter: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. P. Frosch.

Einwirkung normaler Tiersera auf Rotlaufbazillen.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde

der

vereinigten medizinischen Fakultät

der

Grossherzogl. Hessischen Ludwigs-Universität zu Giessen

vorgelegt von

Friedrich Banzhaf
Oberamtstierarzt in Maulbronn.

Druck von Richard Enzig, Stuttgart.
1909.

Aus dem hygienischen Institut der kgl. tierärztlichen Hochschule zu Berlin.
Leiter: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. P. Frosch.

Einwirkung normaler Tiersera auf Rotlaufbazillen.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde

der

vereinigten medizinischen Fakultät

der

Grossherzogl. Hessischen Ludwigs-Universität zu Giessen

vorgelegt von

Friedrich Banzhaf
Oberamtstierarzt in Maulbronn.

Druck von Richard Enzig, Stuttgart.
1909.

Gedruckt mit Genehmigung
der vereinigten medizinischen Fakultät zu Giessen.

Referent: Prof. Dr. Olt.

Die Forschungen auf dem Gebiete der Immunität haben ergeben, dass im Blutserum kranker und immunisierter Tiere Stoffe auftreten, die je nach ihrer Wirkungsart als Antitoxine, Bakteriolysine, Agglutinine und Opsonine bezw. Bakteriotropine bezeichnet werden, und dass allgemein zwischen der erworbenen Immunität und dem Vorhandensein dieser Körper im Blutserum gewisse gesetzmässige Beziehungen bestehen.

Diese Tatsache hat dazu geführt, auch der Frage nach dem Vorhandensein solcher „Immunsubstanzen“ im normalen Serum näher zu treten, sowohl aus praktischen serodiagnostischen Rücksichten, als auch besonders, weil man entsprechend dem Verhalten der Immunsera auch im normalen Serum vorkommende Antikörper in ursächliche Beziehung zum Zustandekommen der natürlichen Immunität brachte. Dies ist hauptsächlich durch die Alexintheorie H. Buchners geschehen, die besonderen Eigenschaften des zellfreien Blutserums die Ursache der natürlichen Immunität zuschreibt (1).

Die bakterientötende Eigenschaft des Blutes wies erstmals Fodor (2) nach, indem er feststellte, dass gewisse Bakterien, wenn sie in vitro der Einwirkung des Blutes, das bei Körpertemperatur aufbewahrt wurde, ausgesetzt wurden, teilweise abstarben. Gleichzeitig konnte er feststellen, dass nachher eine starke Vermehrung der nicht abgetöteten Keime folge.

Nuttall (3) beobachtete, dass das Blut verschiedener Tiere für denselben Mikroorganismus verschieden wirksam sei und dass das Blut derselben Tiergattung die verschiedenen Bakterien sehr ungleichmässig beeinflusse. Er stellte ferner fest, dass das keimtötende Vermögen bei längerer Aufbewahrung, sowie bei Einwirkung höherer Temperaturen verloren gehe.

Nissen (4) fand, dass zwischen der Keimabtötung des Blutes und der Zahl der zugefügten Bakterien eine gewisse Beziehung bestehe, insofern es einen maximalen Zusatz von Bakterien gebe, über den hinaus die Abtötung eine unvollkommene werde.

Von entscheidender Wichtigkeit war jedoch der Nachweis Buchners (5), dass nicht nur das zellhaltige Blut, sondern auch das zellfreie Serum bakterientötende Eigenschaften besitze, die er auf das Vorhandensein von Alexinen zurückführte. Auch er konnte die Tatsache feststellen, dass dasselbe Blutserum auf verschiedene Bakterien ganz ungleichmässig einwirke, dass z. B. durch Kaninchenserum Typhus- und Cholerabazillen viel leichter abgetötet werden als Milzbrand- und Rotlaufbazillen. So hat H. Buchner nachgewiesen, dass ca. 2000 Rotlaufkeime in 2 ccm Kaninchenserum bis auf 356 Keime abgetötet wurden, während dieselbe Quantität Serum Typhusbazillen in dieser Menge vollständig vernichtete. Der Höhepunkt dieser baktericiden Wirkung trat nach seinen Feststellungen gewöhnlich nach 6—7 Stunden auf, und die in dieser Zeit nicht abgetöteten Keime vermehrten sich nachher wieder in starkem Masse.

Was die Einwirkung des Kaninchenserums auf Milzbrandbazillen anbetrifft, so fand Flügge (7), dass nach Massgabe der Plattenzählung bei 378 ursprünglich in 15 Tropfen Serum eingebrachten Bazillen nach einer Stunde Einwirkung im Brutschrank 224, nach zwei Stunden 440, nach 3 Stunden 412, nach 4 Stunden 1870, nach 20 Stunden unzählige Keime festgestellt werden konnten.

Ein vollständiges Fehlen dieser baktericiden Wirkung wurde von Nissen (7) für Rinder- und Pferdeserum gegenüber dem Typhusbazillus festgestellt.

Die ursächlichen Beziehungen dieser Serumalexine zur natürlichen Immunität, wie sie von H. Buchner angenommen wurden, sind vielfach in Zweifel gezogen worden, so von Lubarsch (8), da man in der Folge mehrfach feststellen konnte, dass das Serum eines Tieres baktericid auf einen Bazillus wirken kann, für den das betreffende Tier empfänglich ist und umgekehrt, dass also ein Missverhältnis zwischen der baktericiden Wirkung der Körpersäfte innerhalb und ausserhalb des Körpers besteht.

Wassermann (9) nimmt jedoch auf Grund seiner Versuche, in denen er die Wirkung der Alexine oder Komplemente durch Einspritzung von Antikomplementen ausschliesst, an, dass die angeborene Immunität ihre Ursache wenigstens zu einem Teil und für bestimmte Fälle in dem Vorhandensein von Komplementen bezw. Alexinen im Organismus hat.

* * *

Ausser dem zellfreien Blutserum sind nach den Forschungen Metschnikoffs (10) die zelligen Elemente des Blutes, die Leukocyten, von Bedeutung für das Zustandekommen der natürlichen Immunität. Diese Phagocytenlehre, welche zu Gunsten der Lehre von den baktericiden Serumstoffen besonders im Hinblick auf das von Pfeiffer entdeckte Phänomen der spezifischen Bakteriolyse der Cholera- und Typhusbazillen durch Immunserum fast ganz aufgegeben worden war, ist durch die Entdeckung der Bakteriotropine im Pneumokokken- und Streptokokkenimmunserum von Neufeld (11) und der Opsonine im Normalserum von Wright (12), wenigstens für bestimmte Bakterien, wieder in den Vordergrund gerückt worden.

Schon Metschnikoff hatte Stoffe im Serum nachgewiesen, denen er eine die Phagocytose beschleunigende Wirkung auf die Leukocyten zuschrieb; entgegen dieser Anschauung hatte bereits im Jahre 1895 Denys den Satz aufgestellt (13), dass diese Wirkung nicht von der Modifikation der Leukocyten, sondern von der Veränderung in der Zusammensetzung des Serums abhängig sei.

Diesen Standpunkt vertraten sowohl Wright, als auch Neufeld (14), indem sie feststellten, dass diese die Phagocytose beschleunigenden Körper nur auf die Bakterien wirken, mit den Bakterien eine spezifische Bindung eingehen und ohne die Lebensfähigkeit derselben zu beeinträchtigen, eine Aenderung ihres physikalisch-chemischen Zustandes bewirken. Hierdurch soll gleichzeitig eine Art Lösungsprozess eingeleitet werden und der dabei entstehende gelöste Körper soll als Reiz oder Schmeckstoff für die Phagocyten wirken und zur vermehrten Phagocytose führen.

Weitere Untersuchungen von Meyer (15) und Hata (16) haben gezeigt, dass nur quantitative Unterschiede zwischen Normal- und Immunopsoninen bestehen, und dass ihre Wirkung ähnlich wie die der bereits bekannten Immunkörper auf dem Zusammenwirken von Normal- oder Immunamboceptor und Komplement beruht, von denen das letztere schon im normalen Serum in reichlicherer Menge vorhanden und nicht hitzebeständig ist, die ersteren erst durch die Immunisierung in vermehrter Menge gebildet werden. Das prinzipiell neue, was die Beobachtungen Wrights ergeben haben, ist, dass nicht nur das Immun-, sondern auch das normale Serum gegenüber einzelnen Bakterienarten stark phagocytosebefördernde Wirkung ausübt und dass in diesen Fällen die indirekte Wirkung der Antikörper weit wichtiger ist, als die direkte baktericide.

Diese Anschauung hat ausser der bereits angeführten Wirkungsweise des Pneumokokken- und Streptokokkenimmunserums auch für das Rotlaufimmunserum Bestätigung gefunden. So

fand Deutsch (17) entgegen der ursprünglichen von Voges und Schütz (18) vertretenen Ansicht der rein baktericiden Wirkung des Rotlaufimmunserums, dass in dasselbe eingesäte Rotlaufbazillen nicht nur nicht durch Bakteriolyse zu Grunde gehen, sondern dass sogar eine starke Vermehrung der Keime, wie Plattenversuche zeigten, eintrat.

Des weiteren konnte Prettner (19) nachweisen, dass in den Organen mit Immunserum und Kultur geimpfter Mäuse, die infolge dieser Impfung nicht erkrankten und am Leben blieben, zahlreiche Rotlaufbazillen sich fanden, deren Lebensfähigkeit nicht beeinträchtigt war, wie durch weiteres Ueberimpfen auf Versuchstiere nachgewiesen werden konnte. Diese Tatsachen führten weiter zu der Annahme, dass die Wirkung des Rotlaufserums nicht als baktericide, sondern als opsonische anzusehen sei, dass es, wie Prettner sich ausdrückt, Stoffe enthalte, die den Organismus in nicht näher bekannter Weise in den Stand setzen, die in den Körper eingedrungenen Bakterien unschädlich zu machen.

* * *

Ueber die Beeinflussung der Phagocytose durch normales Serum sind nach der Entdeckung der Opsonine im normalen menschlichen Serum gegenüber den Tuberkelbazillen und den Staphylokokken, insbesondere von Hectoen und Rüdiger (21) sowie von Bächer (22) zahlreiche Versuche angestellt worden. Erstere fanden bei ihren Untersuchungen verschiedener normaler Sera auf ihren Gehalt an Opsoninen für Streptokokken, dass wesentliche Differenzen im Verhalten virulenter und avirulenter Stämme sich zeigten, indem letztere in allen untersuchten Blutserumarten phagocytiert wurden, während sich bei virulenten Streptokokken deutliche Phagocytose nur in Menschen- und Pferdeserum, sehr geringe in Ratten- und Kaninchenserum fand und ganz unwirksam Meerschweinchenserum sich erwies. Die Untersuchungen

Bächers erstreckten sich auf bazillus anthracis, vitrio cholerae, bacterium coli, streptococcus und staphylococcus; geprüft wurden damit Sera von Meerschweinchen, Kaninchen, Pferd, Ratte, Katze und Hund, die Leukocyten stammten von Meerschweinchen, Kaninchen, Ratte und Katze. Hiebei liess sich in allen Fällen eine phagocytosefördernde Eigenschaft der Sera feststellen, jedoch zeigte sich eine solche, wenn auch in geringem Grade, auch in den Kontrollversuchen ohne Serumzusatz. Gruber und Futaki (23) haben eine phagocytosefördernde Wirkung des aktiven Serums gegenüber dem vitrio cholerae asiaticae und dem Hühnercholerabazillus vermisst.

Eine phagocytosefördernde Wirkung der normalen Sera von Schwein, Pferd und Rind gegenüber den Bakterien der hämorrhagischen Septikämie, insbesondere den Schweineseuchebakterien fanden Broll und Angeloff (24), ebenfalls jedoch in weit geringerem Grade, als die der entsprechenden Immunsera.

* * *

Für eine weitere Klasse der Antikörper, der Agglutinine, hat sich ebenfalls gezeigt, dass sie im normalen Serum präformiert sind. Die ersten diesbezüglichen Versuche stellte Bordet (21) mit normalem Pferdeserum bei Cholera- und Typhusbazillen an.

Ueber die Agglutinationswerte der normalen Tiersera gegenüber verschiedenen Bakterien sind von Müller (25) und Rissling (26) eingehende Versuche vorgenommen worden. Uebereinstimmend ist nach den bisherigen Untersuchungen festgestellt worden, dass das normale Serum nur in ganz geringer Menge Agglutinine enthält und dass im allgemeinen die Wirkung sich nicht bloss auf eine einzelne Bakterienart beschränkt, sondern infolge des Vorhandenseins einer Vielheit von Agglutininen auf verschiedene Bakterien sich erstrecken kann. Ferner fand sich,

dass der Gehalt an Agglutininen bei ein und derselben Tierspezies gewissen individuellen Schwankungen unterworfen ist und dass auch das Alter des betreffenden Tieres eine Rolle hiebei spielt, insofern im Serum junger Tiere Agglutinine noch gar nicht oder in quantitativ geringerer Menge vorhanden sind, als in dem erwachsenen Tiere.

* * *

Auf das Vorhandensein von Bakteriolysinen, Opsoninen und Agglutininen gegenüber Rotlaufbazillen sind von mir nun die normalen Sera von Schwein, Pferd, Rind, Schaf und Ziege untersucht worden.

I. Bakteriolysine.

Zur quantitativen Festellung der bakterientötenden Wirkung der einzelnen Tiersera auf Rotlaufbazillen wurde das von Buchner (5), Bering und Nissen (7) angewandte Plattenverfahren eingeschlagen, indem unter Beifügung der üblichen Kontrollen je 0,2 cc 24stündige Rotlaufbazillenkultur der Einwirkung von steigenden Mengen des betreffenden Serums im Brutschrank ausgesetzt wurden. Als Serummenge diente das gleiche, fünf-, zehn- und zwanzigfache Volumen der angewandten Kulturmenge, wobei zur Erzielung gleicher Flüssigkeitsmengen von je 4 cc physiologische Kochsalzlösung zugesetzt wurde. Direkt nach der Mischung, nach 2—3, 5 -7, 20—30 Stunden Einwirkung im Brutschrank wurde nach gründlicher Durchmischung je eine Oese Material auf verflüssigte Gelatine übertragen, der Inhalt in eine sterile Petrischale ausgegossen und die Zahl der gewachsenen Kolonien mittelst der Wolfhügelschen Zählmethode bestimmt.

a) Schweineserum + 0,2 cc Rotlaufbazillenkultur ergänzt mit phys. Kochsalzlösung zu 4 cc Flüssigkeit.

Zahl der Keime nach Stunden.

Kultur zu Serum	0 Std.	3 Std.	7 Std.	24 Std.
1 : 1 0,2 Kultur 0,2 Serum 3,6 Kochsalz	1100	605	935	1815
1 : 5 0,2 Kultur 0,8 Serum 3,0 Kochsalz	880	910	880	2090
1 : 10 0,2 Kultur 1,8 Serum 2,0 Kochsalz	1320	1500	1430	2850
1 : 20 0,2 Kultur 3,8 Serum 0 Kochsalz	1155	1430	2430	3465
Kochsalz-kontrolle 0,2 Rotl.-Kult. 3,8 Kochslös.	2035	1815	2200	3600

b) Ziegenserum.

Kultur zu Serum	0 Std.	3 Std.	7 Std.	24 Std.
1 : 1	1770	1360	1540	12500
1 : 5	850	975	1150	11925
1 : 10	2200	2695	2455	19700
1 : 20	1650	1720	2970	26750
Kochsalz-kontrolle	3665	1850	2235	7920

c) Rinderserum.

Kultur zu Serum	0 Std.	3 Std.	7 Std.	30 Std.
1 : 1	4820	4785	7600	12375
1 : 5	4350	3750	9350	10890
1 : 10	7150	7315	8740	14850
1 : 20	3750	5225	5335	18000
Kochsalz-kontrolle	7105	5775	8750	12350

d) Schafserum.

Kultur zu Serum	0 Std.	3 Std.	7 Std.	30 Std.
1 : 1	5750	4950	9 700	9875
1 : 5	7930	7850	10 490	11 385
1 : 10	7975	8750	10 450	14 300
1 : 20	6390	9950	14 850	13 750
Kochsalz-Kontrolle	6850	5600	9 500	13 500

e) Pferdeserum.

Kultur zu Serum	0 Std.	3 Std.	7 Std.	30 Std.
1 : 1	6050	3850	1950	8 909
1 : 5	6600	950	1485	9 900
1 : 10	2650	2530	2200	12 700
1 : 20	5025	5250	4620	11 200
Kochsalz-kontrolle	850	790	1850	2 900

Aus vorstehenden Versuchen geht hervor, dass eine Keimverminderung allenfalls nur in den Mischungsverhältnissen 1 : 1, fraglich bei 1 : 5 und 1 : 10 zu beobachten war, also in den Fällen, in denen zur Verdünnung Kochsalzlösuug (3,6 sowie 3 und 2 cc verwendet wurde. In gleicher Weise war jedoch auch in den Kontrollplatten, bei denen mit 0,2 cc Rotlaufbouillonkultur und 3,8 cc Kochsalzlösung beschickte Röhrchen als Ausgangsmaterial dienten, eine Verminderung der Keimzahl eingetreten. Eine mehr der Einwirkungsdauer des Serums entsprechende Vermehrung der Keimzahl war bei den mit der zwanzigfachen Serummenge ohne Kochsalzlösung beschickten Kulturen zu beobachten.

Um nun der Frage näher zu treten, ob die nach der vorstehenden Versuchsanordnung angewandte Rotlaufkultur in zu grosser Quantität verwendet wurde, so dass die an und für sich geringe baktericide Kraft der betreffenden Sera nicht zum sichtbaren Ausdruck kam, wurde in einem weiteren Versuche die Kulturmenge auf 0,1 cc herabgesetzt und dieser die zehn- bezw. vierzigfache Menge Serum zugesetzt, wobei im ersten Falle die Mischung mit 3 ccm Kochsalzlösung zur Erzielung gleicher Flüssigkeitsmengen versetzt wurde.

Diese Mischungen wurden einer Temperatur von 37° im Brutschrank ausgesetzt und direkt nach der Mischung, nach vier bezw. zwanzig Stunden Einwirkung im Brutschrank je eine Oese derselben zu einer Gelatineplatte verarbeitet. Hierbei war in den mit der vierzigfachen Serummenge ohne Kochsalzverdünnung beschickten Röhrchen eine geringe Keimvermehrung eingetreten, in den mit Kochsalzlösung verdünnten Proben eine Keimverminderung.

Bemerkenswert ist insbesondere die Beobachtung, dass auch das frische, keine konservierenden Beimengungen enthaltende Rotlaufimmunserum vom Pferd, das hohen Schutzwert besass, in vitro eine bakterientötende oder auch nur entwicklungshemmende Wirkung nicht zeigte.

Einwirkungsdauer.

Tierart	0 Stunden 1 : 10 (0,1 Rotl.-K. 0,9 Serum 3 cc Kochs.)	0 Stunden 1 : 40 (0,1 Rotl.-K 3,9 Serum 0 Kochs.)	4 Stunden 1 : 10	4 Stunden 1 : 40	20 Stunden 1 : 10	20 Stunden 1 : 40
Schwein	—	440	—	704	—	5420
Ziege	290	440	275	495	1210	1199
Rind	680	165	220	1210	3875	4015
Schaf	440	495	385	553	3300	1210
Pferd	715	385	375	1320	1705	5115
Kontrollen: Kochsalz	—	170	—	192	—	3465
Kontrollen: Immunserum	—	360	—	395	—	3025

* *

Gegenstand weiterer Untersuchungen war die Frage, ob der Zusatz normalen Serums des Schweines auf das Wachstum der Rotlaufbazillen in den gewöhnlichen Nährböden irgend welche Einflüsse ausübt.

Zu diesem Zwecke wurden in Reagenzgläsern je 0,01 cc 24stündige Rotlaufbazillenkulturen der Einwirkung von steigenden Mengen frischen Serums im Brutschrank ausgesetzt. Das Serum

wurde durch Centrifugieren gewonnen und gelangte zwei Stunden nach der Blutentnahme zur Verwendung.

Die Gläser wurden nacheinander mit 0,01, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2,5 und 5 cc Serum beschickt und zur Erzielung gleicher Flüssigkeitsmengen von je 5 ccm sterile Bouillon zugesetzt. An Stelle der Bouillon wurde als Ergänzungsflüssigkeit in einzelnen Versuchen physiologische Kochsalzlösung unter Zusatz von je drei Tropfen Bouillon gewählt.

Als Kontrollen dienten in jedem Versuche 5 cc Serum ohne Kulturzusatz und 5 cc Bouillon + 0,01 cc Rotlaufkultur ohne Serumzusatz.

Nach 24 Stunden Einwirkung im Brutschrank war bis zu 1 cc Serumzusatz an Stelle der wolkigen Trübung Bodensatzbildung getreten, während bei geringerem Serumzusatz entsprechend der zugesetzten Menge Serum die wolkige Trübung der Flüssigkeit zunahm. Die Bodensatzbildung und Klärung der Flüssigkeit war auch bei geringerem Serumzusatz (bis zu 0,5 cc) in den nächsten 3—5 Tagen zu beobachten. Bei mikroskopischer Untersuchung fanden sich in diesen Proben die Rotlaufbazillen in grossen Haufen vereinigt, wobei die Gramsche Färbung die einzelnen Bazillen vielfach undeutlich erkennen liess. Wo aber die Bodensatzbildung ausgeblieben war, da lagen auch entsprechend der Zunahme der wolkigen Trübung die Bazillen mehr einzeln und zeigten sich deutlich gefärbt.

Von jeder Probe wurde nach drei Stunden, nach einem, bezw. drei Tagen Einwirkung im Brutschrank je eine Oese entnommen und zur Gelatineplatte verarbeitet, um festzustellen, ob die Keimfähigkeit der veränderten Rotlaufkulturen herabgesetzt war. Hierbei zeigte sich, dass dieselbe weder nach drei Stunden, noch nach ein- bezw. dreitägiger Einwirkung irgendwelche Einbusse erlitten hatte, da in sämtlichen Platten gegenüber den Kontrollen eine Verringerung der Keimzahl nicht zu beobachten war.

Zwecks Untersuchung der Frage, ob derartige der Einwirkung des Serums ausgesetzte Rotlaufbazillen in ihrer Virulenz eine Aenderung erfahren, wurden weisse Mäuse mit je 0,2 cc der centrifugierten und in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmten Kulturen subcutan geimpft.

Nach 24stündiger Einwirkung starben die Tiere nach 3 Tagen bei Einspritzung von Kulturen bis zu 0,5 cc Serumzusatz, während Kontrolltiere, die mit gleich alten Bouillonkulturen ohne Serumzusatz geimpft wurden, nach $2^1/_2$ Tagen starben, nach dreitägiger Einwirkung trat der Tod bei den Kontrolltieren in $2^1/_4$ Tagen ein, bei Zusatz von 0,05 cc Serum in 2—$2^1/_4$ Tagen, bei Zusatz von 0,1—0,5 Serum in $2^1/_2$ Tagen, von 1—2,5 cc Serumzusatz in 3 Tagen und bei Wachstum der Rotlaufbazillen in reinem Serum in 4 Tagen. Bei Einspritzung von 5 Tage der Einwirkung des Serums ausgesetzten Kulturen, die wie vorhin centrifugiert und in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt wurden, starben die Tiere bis zu 2,5 cc Serum in $4^1/_4$ Tagen, bis zu 0,25 cc Serum in $4^1/_2$ Tagen, bis 0,1 cc Serumzusatz in $2^1/_2$ Tagen, während die mit gleich-, d. h. mit 5 Tage, alter Bouillonkultur geimpfte Kontrolltiere in zwei Tagen starben.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass der Zusatz normalen Schweineserums zu Rotlaufkulturen kulturelle Veränderungen hervorruft, derart, dass die Bazillen sich zusammenballen, und wenigstens teilweise ihre Gramfestigkeit verlieren, wobei gleichzeitig, ohne dass sie in ihrer Wachstumsfähigkeit gehindert werden, eine, wenn auch ganz geringgradige und allmähliche, erst im Verlaufe mehrerer Tage sich vollziehende Virulenzabschwächung einhergeht.

Normales Schweineserum ergänzt mit Bouillon zu 5 ccm + 0,01 cc 24stündige Rotlaufbouillonkultur.

Serum-Menge in cc	Nach 3 Std. Einwirkung 1 Oese zu Gelatineplatte. Zahl d. Keime	Nach 1 bezw. 3 u. 5 Tagen Einwirkung 1 Oese zu Gelatineplatte Zahl d. Keime	Subcutane Impfung von weissen Mäusen m. 0,2 cc		
			nach 24 Std. Einwirkung Tod in Tagen	nach 3 Tagen Einwirkung Tod in Tagen	nach 5 Tagen Einwirkung Tod in Tagen
5	7755	über 20 000	3	4	$4\,^{3}/_{4}$
2,5	8070	„	3	3	5
1	9685	„	3	3	$4\,^{1}/_{2}$
0,5	5225	„	3	$2\,^{1}/_{2}$	$4\,^{1}/_{2}$
0,25	8635	„	3	$2\,^{1}/_{2}$	$4\,^{1}/_{2}$
0,1	6875	„	$2\,^{1}/_{2}$	2	$2\,^{1}/_{2}$
0,05	8650	„	$2\,^{1}/_{2}$	$2\,^{1}/_{2}$	$2\,^{1}/_{2}$
Kontrolle	7150	„	$2\,^{1}/_{2}$	$2\,^{1}/_{4}$	2

Um diese geringe, durch das normale Schweineserum veranlasste Virulenzabschwächung der Rotlaufbazillen deutlicher zum Ausdruck zu bringen, wurde die Kulturmenge von 0,01 cc auf 0,0002 cc ($^{1}/_{5000}$ cc) herabgesetzt, und im übrigen die gleiche Versuchsanordnung, wie umstehend, beibehalten. Hiebei zeigte sich bezüglich der Zahl der nach drei Stunden Einwirkung auf

den Gelatineplatten gewachsenen Kolonien, dass in Uebereinstimmung mit den vorhergehenden Versuchen in den mit Serum versetzten Proben nicht nur nicht eine Keimverminderung, sondern eher eine Wachstumsbeschleunigung gegenüber den Kontrollproben zu beobachten war, trotzdem ganz frisches Serum zur Verwendung gelangte, so dass von einer bakterientötenden Einwirkung des normalen Schweineserums auf Rotlaufbazillen im Sinne Buchners nicht geredet werden kann.

Auch bei den nach ein- bezw. dreitägiger Einwirkung entnommenen Proben traten nach Massgabe der Zahl der in Platten gewachsenen Kolonien keinerlei nennenswerten Unterschiede zwischen Serum- und Kontrollplatten hervor.

Bei den Impfungen von weissen Mäusen zeigte sich jedoch, dass nach 24 Stunden Einwirkung Kontrolltiere, die mit 0,2 cc der centrifugierten und in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmten Bouillonkulturen geimpft wurden, in zwei Tagen starben, mit Kulturen von 0,5 cc Serumzusatz geimpfte Mäuse in $3\frac{1}{2}$ Tagen, bei Verimpfung von 5 cc, d. h. von reinem Serum beeinflussten Kulturen in 5 Tagen. Nach dreitägiger Einwirkung starben Kontrolltiere in $2\frac{1}{2}$ Tagen, bei Verimpfung von Kulturen mit 0,1 cc Serumzusatz in $2\frac{1}{2}$ bis 3 Tagen, bei 0,25 cc in 5 Tagen, von 0,5 cc Serumzusatz ab blieben die Tiere am Leben.

Normales Schweineserum + 0,0002 cc 24stündige Rotlaufkultur ergänzt mit Bouillon zu 5 cc Flüssigkeit.

Serummenge	Nach 3 Std. Einwirkung Anlegen einer Gelatinepl.	Nach 24 Std. Einwirkung Anlegen einer Gelatinepl.	Impfung von Mäusen mit 0,2 cc nach 24stündiger Einwirkung Tod in Tagen	nach 3tägiger Einwirkung Tod in Tagen
5	585	27 255	5	lebt
2,5	635	22 275	3 1/2	lebt
1	594	24 750	3	lebt
0,75	605	über 20 000	3 1/2	lebt
0,5	330	„	2 1/2	lebt
0,25	483	„	2	5
0,1	280	„	2 1/2	2 1/2 bis 3
0,05	330	„	2 1/2	2 1/2
Kontrolle	290	„	2	2 1/2

II. Opsonine.

Bei meinen Versuchen über die opsonische Wirkung der normalen Sera von Schwein, Rind, Pferd, Schaf und Ziege auf Rotlaufbazillen wurde die von Leishman und Wright geübte und von Strubell beschriebene Methode gewählt (27).

Zur Verwendung gelangten nach der Versuchsordnung von Neufeld und Rimpau Meerschweinchenleukocyten, die in folgender Weise gewonnen wurden. Ein Meerschweinchen erhielt 6 cc mit einer Messerspitze Aleuronat versetzter steriler Bouillon intraperitoneal eingespritzt und wurde zwanzig Stunden später getötet. Aus der eröffneten Bauchhöhle wurde das Exsudat mittelst Pipetten aufgesogen und nach Aufschwemmung in physiologischer Kochsalzlösung leicht centrifugiert. Nach dem Abgiessen der überstehenden Flüssigkeit wurde der Bodensatz mit Kochsalzlösung nochmals verdünnt, leicht geschüttelt und wieder centrifugiert. Dieses Verfahren wurde bis zur Klärung der überstehenden Flüssigkeit wiederholt und dann der aus Leukocyten bestehende Bodensatz in einigen Kubikzentimetern Kochsalzlösung ungefähr bis zur ursprünglichen Dichte aufgeschwemmt.

Die Sera wurden durch Gerinnen in Glasröhrchen erhalten und nach Abscheiden aus dem möglichst steril entnommenen Blute sofort oder höchstens einen Tag alt verwendet. Die Rotlaufbazillen stammten aus einer 24stündigen Bouillonkultur, die durch Ueberimpfen einer Oese Herzblut einer drei Tage nach der Impfung gestorbenen Maus gewonnen worden war.

Als Kontrollen wurden Leukocytenaufschwemmung ohne Serumzusatz der Einwirkung der Rotlaufbazillen ausgesetzt, sowie frisches Immunserum von vierhundertfachem Titer, das keine konservierenden Beimengungen besass und sowohl in unverdünntem Zustande, als auch in zehnfacher Verdünnung verwendet wurde, während die normalen Sera nur unverdünnt benützt wurden.

Es wurden nun gleiche Volumina von Leukocyten, Bakterien und Serum in lang ausgezogene Pipetten aufgesaugt, die am einen Ende mit Gummihütchen versehen waren. Das andere, lang ausgezogene Ende des Glasröhrchens erhielt im Abstand von ca. 5—6 cc eine Markierung durch Fettstift, bis zu der die Flüssigkeit aufgesaugt wurde. Zwischen jeder Flüssigkeit wurde etwas Luft angesaugt, um die Menge der nachfolgenden Flüssigkeit bestimmen zu können. Das Gemenge wurde auf einen reinen, entfetteten Objektträger ausgeblasen und durch mehrmaliges Aufsaugen und Wiederausblasen gründlich gemischt. Nach dem endgültigen Aufsaugen wurde das Ende in der Stichflamme zugeschmolzen.

Nach 20—30 Minuten langer Einwirkung im Brutschrank wurde der Inhalt des Röhrchens auf Objektträger tropfenweise verteilt. Vermittelst der Kante eines abgebrochenen Objektträgers, welcher eine leicht konkave Form besass, wurden nun Ausstrichpräparate angefertigt. Die Fixierung geschah mit einer Mischung von Aether und Alkohol, die Färbung mit Methylenblaulösung, nach Giemsa, sowie nach Gram. Bei Anwendung der Gramschen Methode zeigten sich die Bazillen deutlicher hervortretend, während die Struktur und insbesondere die äussere Kontur der Blutkörperchen bei Methylenblaufärbung sowie bei Anwendung der Methode nach Giemsa deutlicher zum Ausdruck kam.

Um das Mass der Phagocytose feststellen zu können, wurden die von einer bestimmten Anzahl Leukocyten — es wurden teilweise bis zu 200 berücksichtigt — aufgenommenen Rotlaufbazillen gezählt und die Zahl der aufgenommenen Bazillen durch die Zahl der Leukocyten dividiert. Die so gewonnene Zahl wurde, wie von Wright angegeben, als phagocytische Zahl bezw. als opsonischer Index bezeichnet.

Die Versuche wurden mehrfach wiederholt. Hiebei zeigte sich, dass der opsonische Index bei Verwendung von Serum verschiedener Tiere derselben Spezies, gewissen Schwankungen

unterworfen war. Auch scheinen bezüglich des Alters der Tiere, von denen das Serum stammt, gewisse Unterschiede zu bestehen, da in einem Versuche beim Kalbserum ein weit niederer Index gefunden wurde, als bei einem ausgewachsenen Rinde.

Opsonischer Index der normalen Sera.

Tierart		Mittelwerte	Grenzwerte
Schwein		0,5	0,3—0,9
Rind		0,6	0,2—0,9
Pferd		0,4	0,2—0,6
Schaf		0,3	0,1—0,5
Ziege		0,5	0,4—0,7
Kontrollen	Kochsalz	0,1	0—0,3
	Immunserum	3,4	2,6—4,5
Immunserum Verdünnung 1:10		2,0	1,2—2,2

III. Agglutinine.

Zwecks Feststellung der Höhe der Agglutinationsfähigkeit der normalen Tiersera auf Rotlaufbazillen wurde die von Neisser und Pröscher (29) entworfene Methode der Serumverdünnung angewandt.

Zwei kleine Reagenzgläser werden mit je 1 cc des betreffenden normalen Serums beschickt; in das zweite, sowie in eine Reihe weiterer Gläser kommen je 1 cc physiologische Kochsalzlösung. Aus Glas II, in dem je 1 ccm Serum und Kochsalzlösung sich befinden, wird nach Umschütteln der Flüssigkeit ein Kubikzentimeter in Glas III überpipettiert, aus Glas III in IV und so fort. Um 10fache Serumverdünnungen zu erhalten, wird ein weiteres Glas mit 0,4 cc Serum und 1,6 cc Kochsalzlösung beschickt, aus diesem kommen in gleicher Weise wie vorhin, nacheinander je 1 cc in vorher mit je 1 cc Kochsalzlösung beschickte Röhrchen. Man hat demnach im ersten Falle nacheinander ein Glas mit unverdünntem Serum, die Verdünnungen 1 : 2, 4, 8, 16, 32 und so weiter, im zweiten Falle die Verdünnungen 1 : 5, 10, 20, 40 etc.

An Stelle der sonst meist verwendeten Zerreibungen von Agarkulturen wurden wegen des geringen Wachstums der Rotlaufbazillen auf diesem Nährboden 24stündige Bouillonkulturen, je 1 ccm zu einem Röhrchen zugesetzt, verwendet, so dass nacheinander die Verdünnungen erreicht wurden: 1 : 2, 4, 8, 16 u. s. w., ferner 1 : 10, 20, 40 u. s. w.

Die Untersuchung erfolgte nach 2—3 Stunden Einwirkung im Brutschrank, es war jedoch nach dieser Zeit eine makroskopisch sichtbare Zusammenballung bezw. Bodensatzbildung und Klärung der Flüssigkeit in einzelnen Versuchen noch nicht eingetreten, so

dass die Einwirkung bis zum Eintritt einer makroskopisch sichtbaren Wirkung auf 5—8 Stunden, teilweise bis auf 24 Stunden ausgedehnt werden musste.

Bei derart langer Beobachtungsdauer spielte, wie schon Konrich (28) angibt, die Temperatur, in der die Mischungen gehalten wurden, eine ganz nebensächliche Rolle, da die gleichen Resultate sowohl bei Einwirkung im Brutschrank, als bei Zimmertemperatur sich ergaben.

Die Intensität der Agglutination wurde, wie üblich, bezeichnet.

++ vollständige Verklumpung und Klärung der Flüssigkeit.
+ deutliche makroskopisch erkennbare Häufchenbildung.
Spur: unvollständige Verklumpung, teilweise Trübung der Flüssigkeit, jedoch bei schwacher Vergrösserung zahlreiche Häufchenbildung.

Agglutination wurde nur bei Anwesenheit makroskopisch erkennbarer Flocken- und Körnchenbildung angenommen, die nach Schütteln der Röhrchen in dem schräg gehaltenen Reagenzglase sichtbar waren, und nur im Zweifelsfalle bei teilweiser Trübung wurde durch Aufbringen eines Tropfens auf den Objektträger auf Häufchenbildung untersucht. Als Kontrollen dienten mit je 1 cc Kochsalzlösung und Rotlaufkultur, sowie mit Serum und Kochsalzlösung ohne Kulturzusatz beschickte Röhrchen.

Mittlere Agglutinationswerte der normalen Sera auf Rotlaufbazillen.

Serum-Verdünng.		Schwein	Pferd	Rind	Schaf	Ziege	Immunser. Pferd
Kontrolle	Serum + Kochs.	—	—	—	—	—	—
	Kultur + Kochsl.	—	—	—	—	—	—
1 : 2		++	++	++	++	++	++
1 : 4		++	++	++	++	++	++
1 : 8		++	++	++	++	++	++
1 : 10		++	++	+	++	+	++
1 : 16		++	++	+	+	+	++
1 : 20		++	++	Spur	Spur	Spur	++
1 : 32		Spur	Spur	—	—	—	++
1 : 40		—	Spur	—	—	—	++
1 : 64		—	—	—	—	—	++
1 : 128		—	—	—	—	—	bis 1024

Demnach wurden die Rotlaufbazillen am stärksten vom Schweine- und Pferdeserum agglutiniert bis 1 : 32 bezw. 40. Es trat auch bei dem Serum dieser beiden Tierspezies die Reaktion am raschesten, meist schon nach einigen Stunden auf, während

bei dem Serum des Rindes, Schafes und der Ziege eine Agglutination nach 2 bis 3 Stunden vielfach noch nicht eingetreten war.

Weiter liess sich feststellen, dass bei Anwendung von Serum, das von verschiedenen Tieren einer und derselben Tierspezies gewonnen wurde, die Agglutinationsfähigkeit innerhalb gewisser Grenzen schwankte und dass auch das Alter des Tieres, wie die Unterschiede des Serums vom Kalbe und vom erwachsenen Rinde zeigen, hiebei eine gewisse Rolle spielt.

Die von mir gefundenen Grenzwerte ergeben sich aus nachstehender Tabelle.

Tierart	Schwein	Pferd	Rind	Kalb	Schaf	Ziege
Serum-Verdünnung	8 64	20—40	16—32	0—20	16—40	16—20

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen lassen sich in nachstehenden Schlussfolgerungen zusammenfassen:

1. Die normalen Sera von Schwein, Pferd, Rind, Schaf und Ziege üben auf die Rotlaufbazillen keine baktericide Wirkung aus.

2. Durch die Einwirkung des normalen frischen Schweineserums erfahren die Rotlaufbazillen eine geringgradige und erst im Verlaufe mehrerer Tage sich allmählig vollziehende Virulenzabschwächung, ohne dass das Wachstum und die Keimfähigkeit derselben beeinträchtigt wäre.

3. Sämtliche untersuchten Tiersera üben auf die Rotlaufbazillen einen die Phagocytose beschleunigenden Einfluss aus; der Gehalt an Opsoninen ist jedoch bei jedem der betreffenden Sera im Verhältnis zu dem des Rotlaufimmunserums als gering zu bezeichnen.

4. Der Gehalt an Agglutininen gegenüber den Rotlaufbazillen ist bei den normalen Seris von Schwein, Pferd, Rind, Schaf und Ziege gering und bei jeder Tierspezies individuellen Schwankungen unterworfen.

Literatur.

1. **Hahn,** Die natürliche Resistenz, in Kolle-Wassermann Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, Bd. IV, 1.
2. **Fodor,** Die Fähigkeit des Blutes, Bakterien zu vernichten. Deutsche medizinische Wochenschrift 1887, No 34.
3. **Nuttall,** Die bakterienfeindlichen Einflüsse des tierischen Körpers Zeitschrift für Hygiene, Bd. IV 1888, S. 353.
4. **Nissen,** Zur Kenntnis der bakterienfeindlichen Eigenschaft des Blutes. Zeitschrift für Hygiene, Bd IV 1888, S. 487.
5. **Buchner,** Die bakterientötende Wirkung des zellfreien Blutserums. Centralblatt für Bakteriologie 1889, Bd. V, No. 23, Bd. VI, No. 1 u. No. 21, S. 562.
6. **Flügge,** Ueber Abschwächung virulenter Bakterien und erworbene Immunität. Zeitschrift für Hygiene 1888, S 208.
7. **Behring** und **Nissen,** Ueber bakterienfeindliche Eigenschaften verschiedener Blutserumarten. Zeitschrift für Hygiene, Bd. 8, S. 412.
8. **Lubarsch,** Ueber die baktericiden Eigenschaften des Blutes und ihre Beziehungen zur Immunität. Centralblatt für Bakteriologie 1889, Bd. VI, No. 18, S. 481 und No. 20, S. 529.
9. **Wassermann,** Ueber die Ursache der natürlichen Widerstandsfähigkeit Deutsche medizinische Wochenschrift 1901, No 4.
10. **Metschnikoff,** Die Phagocytenlehre Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von Kolle-Wassermann, Bd. IV, 1.
11. **Neufeld** und **Rimpau,** Mitteilungen über die Immunität gegen Streptokokken und Pneumokokken. Deutsche med Wochenschrift 1904, No 40 und Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten, Bd. 51 1905, S. 283.
12. **Wright,** Referat von Weil, Ueber phagocytosebefördernde Stoffe der Normal- und Immunsera. Centralblatt für Bakteriologie, I. Abt., Bd. 42, No. 11.
13. **Denys et Le clef,** Sur le mécanisme de l'immunité chez le lapin vacciné contre le streptocoque pyogène. Bull. de l'Academie de royale med. de Belgique. Ref. in Centralblatt für Bakt., 1. Abteil, Ref. Bd. 24, S. 685
14. **Neufeld,** Ueber die Grundlagen der Wrightschen Opsonintheorie. Berliner klinische Wochenschrift 1908, No 21, S 993.

15. **Meyer,** Ueber die phagocytosebefördernden Substanzen des Blutserums. Berliner klinische Wochenschrift 1898, No. 20, S. 951.

16. **Hata,** Ueber Konstitution und Spezifität der Opsonine im normalen Serum. Zeitschrift für Hygiene und Inf.-Krankheiten, Bd. 61, Heft 1.

17. **Deutsch,** Beiträge zur Kenntnis des Schweinerotlaufserums. Centralblatt für Bakteriologie, I. Abt. Originale Band 33, S. 214.

18. **Schütz & Voges,** Deutsche tierärztliche Wochenschrift 1899, S. 177.

19. **Prettner,** Untersuchungen über Rotlaufimmunität bei Serumimpfungen. Centralblatt für Bakteriologie I, Bd. 43, S. 832.

20. **Bordet** Annales Pasteur 1899.

21. **Hectoen** und **Rüdiger,** Studies in Phagocytosis. Journ. Inf. Dis. V, II 1905, S. 128.

22. **Bächer,** Ueber Beeinflussung der Phagocytose durch normales Serum. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten, Bd. 57 1907, S. 33.

23. **Gruber & Futaki,** Münchner med. Wochenschrift 1906, No. 1.

24. **Broll & Angeloff,** Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten der Haustiere, IV. Bd, 5./6. Heft.

25. **Müller,** Agglutination normaler Tiersera, Inauguraldissertation Bern 1901.

26. **Rissling,** Beiträge zur Biologie normaler Tiersera. Centralblatt für Bakteriologie, I. Abt, Bd. 44, S. 452.

27. **Strubell,** Ueber opsonische Technik. Deutsche med. Wochenschrift 1908, No. 19, S. 812.

28. **Konrich,** Ueber den Einfluss der Wärme und Zeit auf den Ablauf der Agglutination. Centralblatt für bakt. Abt., Orig.-Bd. 48, H. 1.

29. **Neisser & Pröscher,** Centralblatt für Bakteriologie 1902, 31. Bd., S. 400.

Lebenslauf.

Am 27. Juni 1880 bin ich, Friedrich Banzhaf, als Sohn des Schultheissen und Landwirts Friedrich Banzhaf in Eglosheim, Oberamts Ludwigsburg, geboren. Nach Erlangung der Primareife am Kgl. Gymnasium in Ludwigsburg bezog ich die Kgl. Tierärztliche Hochschule zu Stuttgart, legte dort im Sommersemester 1899 die naturwissenschaftliche Prüfung, im Juli 1901 die Approbationsprüfung als Tierarzt und im Dezember 1903 die Staatsprüfung in der Tierheilkunde ab. Vom Juli 1901 bis September 1903 war ich als Assistent bezw. Stellvertreter in Engen, Tübingen, Stuttgart und Gerabronn tätig. Nach Ableistung meiner aktiven Dienstpflicht in Ludwigsburg übernahm ich die Distriktstierarztstelle in Tengen, bad. Bezirksamts Engen, im Oktober 1904, um vom Juni 1906 bis Januar 1908 als stellv. Oberamtstierarzt in Gaildorf, Schwäb. Hall und Riedlingen Verwendung zu finden. Im Juli 1908 bestand ich als Extraneer das Maturitätsexamen am K. Gymnasium zu Esslingen, von da bis Januar 1909 war ich als Volontär am hygienischen Institut der Kgl. Tierärztlichen Hochschule in Berlin tätig. Am 18. Januar 1909 erhielt ich die Anstellung als Oberamtstierarzt in Maulbronn.